

1/10
März 1970
1981

WIDENWENT PUBLICATIONS LTD

① BUNDESREPUBLIK ① Offenlegungsschrift ① DE 29 44 138 A 1 G 01 N 35/08

DEUTSCHLAND

Altenbergen

Ammerländer

Offenlegungsschrif

DEUTSCHES

PATENTAMT



DE 29 44 138 A 1
2 11 79
11 6 81

① Anmelder
Technicon GmbH, 5300 Bad Vilbel DE

② Erfinder

Asperger, Prof. Dr med., Gund, Med., Dr rer nat.,
Horst Dürmehs, 4400 Münster, DE, Saecht, Dipl. Chem.,
Dr rer nat., Werner Jähn, Unter DE, Weiler, Dipl. Phys.,
Rauner, 5300 Bad Vilbel, DE

DE 29 44 138 A 1

Peter
Reichel
61131
Würzburg

TECHNIKUCH

1. Verfa.
Analysens
Durchflus
d a d u r
daß man d
tenen oce
Inkubatio
führen a
Probenstr
durch abs
einen all

2. Verfa.
Lipoprote
Über die
d a d u r
daß man al
aus Phosph
Density-Li
ausfällt,
tio den a
bleibenden
und der er

Prüfungsantrag vom 1.4.1979 ist gestellt

② Vorrichten und Verfahren zur Durchführung von Analysen in automatischen Analyseersystemen unter Abtrennung von Rührungsmechanismen

1011

DE 29 44 138 A 1

REST AVAILABLE COPY

W. a. b.
0 01 0 30/00

DE 29 44108 A 1

Ab. Dr. rer. nat.,
Sensche, Dipl.-Chem.
L. Wacker, Dipl.-Phys.Patentanwälte
Reichel u. Reichel
8 Frankfurt a. M. 1
Postfach 19

9362

2944138

TECHNICON GMBH, 6368 Bad Vilbel-1

Patentansprüche

1. Verfahren zur Durchführung von Analysen in automatischen Analysensystemen, die nach dem Prinzip des kontinuierlichen Durchflusses arbeiten, unter Abtrennung von Niederschlägen, dadurch gekennzeichnet, daß man den in einer zu analysierenden Flüssigkeit enthaltenen oder in ihr erzeugten Niederschlag - ggf. nach einer Inkubationszeit - in einem horizontal und geradlinig geführten Abschnitt eines gleichmäßig mit Luft segmentierten Probenstromes absitzen läßt, den sedimentierten Niederschlag durch Absaugen entfernt und aus dem verbleibenden Probenstrom einen aliquoten Teil zur Analyse entnimmt.

2. Verfahren nach Anspruch 1 zur Bestimmung von High-Density-Lipoproteinen (HDL), insbesondere in Körperflüssigkeiten, über die Messung des Cholesteringehalts, dadurch gekennzeichnet, daß man aus der verdünnten Probe durch Zusatz eines Reagenzien aus Phosphorwolframsäure und Magnesiumchlorid die Very-Low-Density-Lipoproteine (VLDL) und Low-Density-Lipoproteine (LDL) ausfüllt, die Probe anschließend inkubiert, nach Sedimentation des abgesetzten Niederschlag absaugt und aus dem verbleibenden Flüssigkeitsstrom einen aliquoten Teil entnimmt und der enzymatischen Cholesterinanalyse zuführt.

130024/0034

1138

- 2 -

2944138

tischen
lichen
ungen,

thal-
einer
ge-
erten
rachlag
benstrom

-Density-
ten,

reagenses
y-Low-
ine (LDL)
menta-
ver-
nimmt

3. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 mit durch eine Förderpumpe -perrbaren und für den Durchflus freigebaren Zuführungsleitungen für Waschflüssigkeit, Luft, Probe und Reagenzien, einem Probennehmer, der von einem Probenteller Anteile der zu untersuchenden Flüssigkeit und Waschflüssigkeit in die Probenzuführungsleitung eingibt, einer Einmündung der Luftleitung in die Probenleitung, einer stromabwärts davon angeordneten Einmündung einer Reagenzienleitung in die Probenleitung, einer davon stromabwärts angeordneten Mischspirale mit Heizbad sowie einem Fotometer und einem Registriergerät, das durch gekennzeichnet, daß zwischen den Einmündungen von Luft- und Reagenzienleitung, ggf. nach der Einmündung einer Füllungsreagenzienleitung und bzw. oder Einkalzung einer Mischspirale (5) zur Inkubation der Ausfällung, eine aus horizontal und geradlinig verlaufenden Leitungssabschnitten bestehende Sedimentationsschlaufe (6) mit einem Auslauf für den Niederschlag (3) und einem Auslauf für die überstehende Flüssigkeit (4) vorgesehen ist.

4. Vorrichtung gemäß Anspruch 3 zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 oder 2, das durch gekennzeichnet, daß zwischen der Einmündung der Luftleitung und der Sedimentationsschlaufe (6) die Einmündung einer Füllungsreagenzienleitung und stromabwärts davon daran anschließend eine Mischspirale (5) vorgesehen sind und daß der Abschnitt von der Einmündung der Füllungsreagenzienleitung bis zum Ende der Mischspirale (6, 5) aus einem antikohäsiven Werkstoff, insbesondere Polytetrafluorethylen, besteht oder mit ihm umgekleidet ist.

130024/0034

4138

- 3 -

2944138

TECHNICON GMBH, 6368 Bad Vilbel-1

für
Nach-
-
Inter-
roben-
klei-
ange-
Tuben-
spirale
Gerät..

en-
enz-
(5)
nd
de Se-
oder-
tätig-

a Ver-

Sedil-
reagens-
ne Misch-
n der
er Misch-
ubeson-
gekleidet

**Verfahren und Vorrichtung zur Durchführung
von Analysen in automatischen Analysensystemen
unter Abtrennung von Niederschlägen**

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Durchführung von Analysen in einem kontinuierlichen Fließsystem unter Abtrennung von Präzipitaten, die entweder mit der Probe zugeführt werden oder im Verlauf einer Reaktion entstehen. Die Analyse wird dann mit einem Teil des klaren Überstandes durchgeführt.

Die Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Bestimmung von High-Density-Lipoproteinen (HDL) über die Messung des Cholesteringehaltes, bei dem zuvor die Low- und Very-Low-Density-Lipoproteine (LDL bzw. VLDL) ausgetilgt werden müssen.

Die Hypercholesterinämie ist als primärer Risikofaktor für das Auftreten der koronaren Herzkrankheiten seit 25 Jahren bekannt. Jüngste Befunde scheinen allerdings an der Allgemeinverbindlichkeit des Gesamt-Serumcholesterinspiegels als eines Risikofaktors gewisse Modifikationen erforderlich zu machen. In vielfältigen Studien konnte die Bedeutung des HDL-Cholesterins nachgewiesen werden. Aufgrund einer Vielzahl von Befunden stellte sich das HDL-Cholesterin - im Gegensatz zum Gesamt-Cholesterin - als ein Schutzfaktor gegen die koronare Herzkrankheit dar; niedrige HDL-Cholesterinspiegel sind als Risikofaktor für die koronare Herzkrankheit anzusehen.

130024/0034

138

- 4 -

2944138

HDL-Cholesterin läßt sich einfach und spezifisch durch eine enzymatische Reaktion mit nachfolgender Farbentwicklung bestimmen, wenn zuvor die anderen Lipoproteine mit geringerer Dichte abgetrennt werden. Aus einer Reihe von Veröffentlichungen geht hervor, daß ein Reagenz aus Phosphorwolframsäure und Magnesiumchlorid spezifisch VLDL- und LDL-Anteile im Serum ausfällt, während HDL in Lösung verbleibt.

Aus der Methodenbeschreibung "HDL-Cholesterin" der Firma Boehringer Mannheim aus dem Jahre 1979 ist ein manuelles Verfahren unter Einsatz des genannten Reagenzies bekannt, das sich aus den folgenden Arbeitsschritten zusammensetzt: Abmessen der Probe, Zusatz einer abgemessenen Reagenzmenge, Mischen des Ansatzes, Inkubation für eine bestimmte Zeit, Zentrifugation für eine bestimmte Zeit mit vorgegebener Leistung, Abnahme des Überstandes, Einsatz eines aliquoten Teils zur Cholesterinbestimmung, Zugabe einer abgemessenen Menge von Cholesterin-Reagenz, Inkubation für eine bestimmte Zeit und fotometrische Bestimmung des entstandenen Farbstoffes.

Aufgabe der Erfindung ist es, eine derartige aufwendige manuelle Arbeitsweise durch ein automatisches Analysenverfahren zu ersetzen, das sich dadurch auszeichnet, daß unabgemessene Proben eingesetzt werden können und keine Pipettier- und Zentrifugierschritte erforderlich sind.

Gegenstand der Erfindung sind das in den Ansprüchen 1 und 2 gekennzeichnete Verfahren sowie die in den Ansprüchen 3 und 4 gekennzeichnete Vorrichtung.

Die Erfindung wird im folgenden an Hand von Zeichnungen näher erläutert, wobei

d eine
onti-
steten,
Verlauf
einem
en und
opro-
s, bei
: (LDL

tofaktor
: 29
an der
anspiegels
rderlich
nung des
r Viel-
- im
kter
Chole-
e Heri-

verla-
Prober

erfin-
einsti

fahrer-
bedeu

sind
dungs;

sigkei
benach
und in
Dichte
der un
Sedime
abgesa
Nieder
tionss
Teil a
segmen
und in
ausgew

130024/0034

344138

- 5 -

2944138

isch durch
entwicklung
t geringe-
Veröffent-
orwolfram-
DL-Antiale
t.

ne der
ein meno-
nzes be-
zusammen-
ben Rea-
ine be-
leit mit
Einsatz
Zugabe
Inkuba-
stimmung

• aufwen-
Analysen-
net, das
d keine
sind.

sprüchen
en Ansprü-

• Zeichnam-

Fig. 1 eine schematische Darstellung des Stromungs-
verlaufs in einem durch zwei Luftblasen-segmentierten
Probenabschnitt,

Fig. 2 eine schematisierte Ansicht einer bei der
erfindungsgemäßen Vorrichtung verwendeten Sedimentations-
einrichtung und

Fig. 3 ein Fließschema des erfindungsgemäßen Ver-
fahrens

bedeuten.

Für eine ausreichende Sedimentation in vertretbarer Zeit
sind zwei Voraussetzungen notwendig, wie sie in dem erfin-
dungsgemäßen Verfahren verwirklicht sind:

1. Gleichmäßige Luftsegmentierung des Stromes,
2. horizontaler und geradliniger Fluss bei Vermeidung
jeglicher Störung des Stromungsverhaltens, wie er
gemäß Abb. 1 zu einer völlig symmetrischen Strom-
ungsverteilung führt.

Durch die zweiseitige Begrenzung des strömenden Flüs-
sigkeitssegments mit zwei Luftblasen werden die der Wand
benachbarten Flüssigkeitsschichten in die Mitte des Segments
und in Fließrichtung transportiert. Teilchen mit größerer
Dichte als der der Flüssigkeit reichern sich sehr schnell in
der unteren Hälfte des Flüssigkeitssegments an. Wird nach der
Sedimentationsstrecke etwa die Hälfte des Stroms nach unten
abgesaugt, verbleibt ein fast klarer Überstand. Verbleibende
Niederschlagsreste setzen sich auf einer zweiten Sedimenta-
tionsstrecke ab. Zur Analyse wird von oben ein aliquoter
Teil abgenommen und in bekannter Weise etwa mit einem luft-
segmentierten Strom aus Analysenreagens in Kontakt gebracht
und inkubiert, wonach die erhaltenen Farbreaktionen fotometrisch
ausgewertet wird. 130024/003

D
Anspruch
angewandt
Probenu-
saugten
und inku-
Absaugen
undert s
rig-fett
wenn die
Schluß
Die Best
Niedersc
entsprec

O
4
RCC
Cf

HC

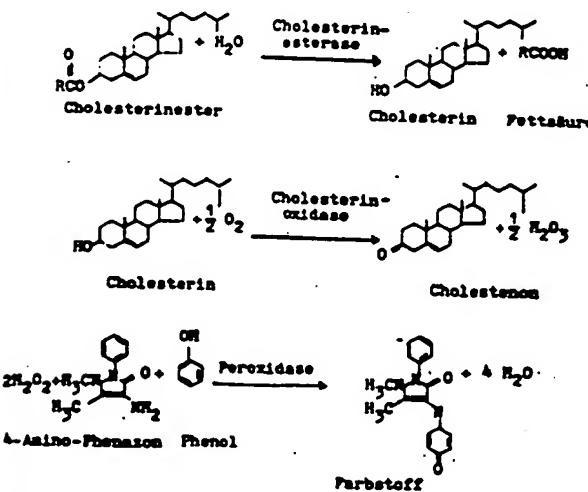
$2H_2O_2 + H_2$
 H_2C
4-Amino-

138

- 6 -

2944138

Das allgemeine Verfahren nach Anspruch 1 wird gemäß Anspruch 2 zur automatischen Bestimmung von HDL-Cholesterin angewandt. Das Verfahren verläuft vollautomatisch von der Probenaufnahme bis zur fotometrischen Auswertung. Die angesaugten Proben werden verdunnt, mit Füllungsreagenz versetzt und inkubiert, bevor der Niederschlag nach Sedimentation durch Abseihen entfernt wird. Der Niederschlag der Lipoproteine verändert sich im Verlauf der Inkubation: Anfangs ist er schmierig-fettig und bleibt daher leicht an der Gefäßwandung haften, wenn diese nicht aus antiadhsivem Material besteht. Zum Schluss besitzt er jedoch eine fast körnige, feste Konsistenz. Die Bestimmung der Cholesterinkonzentration erfolgt in der vom Niederschlag befreiten Lösung nach einer enzymatischen Reaktion entsprechend den folgenden Gleichungen:



130024/0034

Die Analysenvorrichtung zur Durchführung der Verfahren gemäß der Erfindung besteht gemäß Fig. 3 beispielsweise aus einem Probennehmer 1, einer Pumpe 2, einer analytischen Einheit, die eine Mischspirale 5, ein Heizbad 7 mit einer weiteren Mischspirale und eine Sedimentationsschlange 6 enthält, sowie einem Einkanal-Durchflussfotometer 3 mit einer Kuvette von 15 mm Länge und 1,5 mm Durchmesser sowie einem Einkanal-Linienschreiber 4. Vorzugsweise sind das Zugabefitting 8 und die Inkubationsschlange 9 aus einem anti-adhäsiven Werkstoff, insbesondere Polytetrafluorethylen (PTFE), gefertigt oder mit einem derartigen Werkstoff auskleidet, um ein Anhaften der Ausfällungen an der Wand zu vermeiden.

Beispiel

Die Bereitstellung der Proben (Serum) erfolgt in Kunststoffbechern, die sich im Probenteller des Probennehmers 1 befinden. Die Proben werden eine nach der anderen unter Zwischenabschaltung von Waschflüssigkeitsabschritten in einem derartigen Rhythmus angesaugt, daß das Proben/Waschflüssigkeits-Zutnahmeverhältnis 6:1 beträgt und 60 Proben/h verarbeitet werden. (Diese Betriebsweise kann variiert werden.)

Das die Waschflüssigkeit enthaltende Gefäß im Probennehmer wird über die Pumpe 2 mit 2 ml Wasser/min versorgt. Über dem in der Pumpe 2 installierten Probenanschlauch mit einer Förderleistung von 0,16 ml/min wird das Serum in einem luftsegmentierten Strom von Füllungsgreagenz mit Wetzmittel (1,0 ml/min) über eine Zugabestelle 8 aus Polytetrafluorethylen (PTFE) zudosiert. Der Luftschlauch fördert 0,42 ml Luft/min. Das Füllungsgreagenz ist wie folgt zusammengesetzt:

0,5 %
6,25 mM
20 mM
pH 7,1
5 ml P

Nach der
25 Windungen
schlange 6 :
schlaug 8 wird
Überstand =
Flüssigkeit
Luft segnen
der in eine
optische Di
Probe entst
gemessen. D

Wa/Gu

8

- 6 -

2944138

uren
aus
Elo-
rei-
de-
ter
re-
-
10-
inst-
s 1

ch-
m/h
ver-

10-
gt.
e
einen
tel
r-
ml

0,5 % Phosphorwolframsäure
6,25 mM Magnesiumchlorid
20 mM Natriumhydroxid
pH 7,1
5 ml Polyoxyethylenlauryläther (Brij 35) pro 1000 ml

Nach der Inkubation in der PTFE-Mischspirale 5 mit 25 Windungen fließt der Strom durch die Sedimentations- schlange 6 mit 1 Windung (Fig. 2). Der angereicherte Niederschlag 8 wird mit 0,8 ml/min nach unten abgesaugt. Aus dem Überstand wird am Ende mit 0,16 ml/min ein Teil A der Flüssigkeit und der Luftblasen abgenommen und einem mit Luft segmentierten Strom aus Cholesterinreagens zudosiert, der in einer Heizschlange bei 37 °C inkubiert wird. Die optische Dichte des in der enzymatischen Reaktion mit der Probe entstehenden Farbstoffes wird im Durchflussfotometer 3 gemessen. Das Ergebnis erscheint auf dem Schreiber 4.

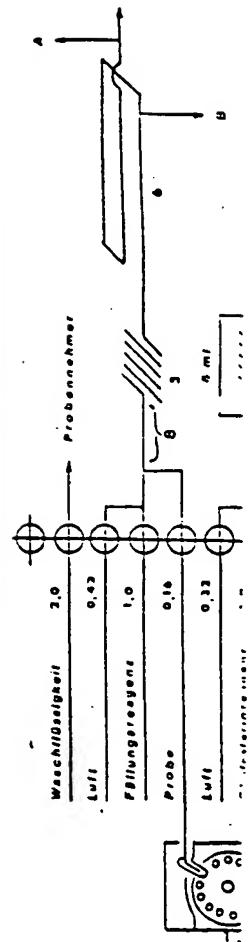
Wa/Os

130024/0036

DERWENT PUBLICATIONS LTD.

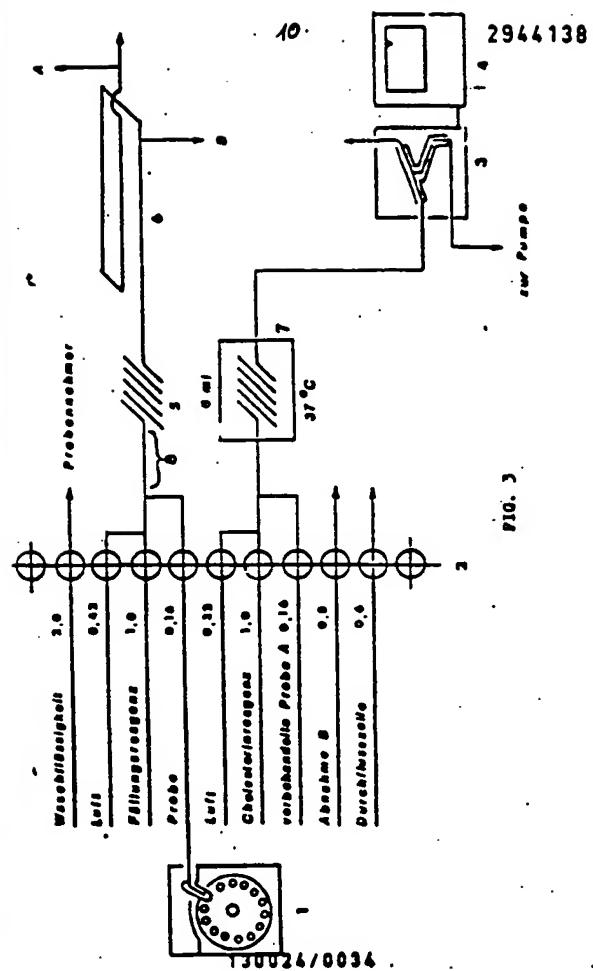
DERWENT PUBL

9.
Leerseite



DERWENT PUBLICATIONS LTD.

DERWENT PUB



DERWENT PUBLICATIONS LTD.

DE

4138

41.
2944138

DE 2000
000 2000
1. November 1980
11. April 1982



FIG. 1

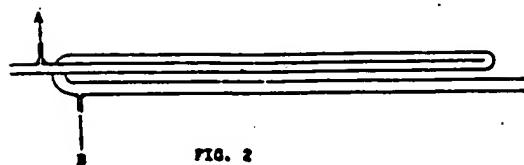


FIG. 2

130024/0036

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.